Mitgeteilt an der Generalversammlung der schweizerischen zoologischen Gesellschaft in Bern, den 10. und 11. März 1934.

Die Entwicklungsleistungen bastardmerogonischer Keimteile von Triton in vitro[1].

von

Ernst HADORN

(Aus dem Zoologischen Institut der Universität Bern.)

Mit 3 Textfiguren.

Ein Merogon ist ein Organismus, der sich ohne mütterliches Kernmaterial entwickelt; ein Bastard-Merogon entsteht dann, wenn das entkernte Eiplasma der einen Art mit Spermachromatin einer fremden Art versorgt wird.

Die bastardmerogonische Entwicklung zeigt die folgenden Gesetzmässigkeiten, die übereinstimmend sowohl bei Echinodermen wie auch bei Amphibienkombinationen festgestellt wurden (Literatur ausführlich cit. bei Hadorn 1932): Die ersten Entwicklungsschritte werden normal ausgeführt; auf einem bestimmten Frühstadium tritt ein typischer Entwicklungsstillstand ein, der das Absterben einleitet. Das Stadium, bis zu dem ein Bastardmerogon gelangen kann, ist je nach Artkombination verschieden (Baltzer 1920, 1930, 1933).

Wir beschäftigen uns im folgenden mit der *Triton*-Kombination: *palmatus*-Plasma × *cristatus*-Kern = (p) c. Es handelt sich hier um 2 Arten, die sich recht stark unterscheiden. Der Plasmalieferant

[1] Die Explantationsexperimente sind ausführlich beschrieben und diskutiert in einer Arbeit, die in Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik, Bd. 131, 1934 erscheint.

ist der kleine braune Faden-Molch, der Kernlieferant der mehr als doppelt so grosse Kamm-Molch. Der echte Bastard: *palmatus* ♀ × *cristatus* ♂ ist lebensfähig und gelangt bis über die Metamorphose hinaus. Wir fragen nun, was diese Kombination als merogonischer Bastard, d.h. ohne die Mitwirkung des mütterlichen Artchromatins leistet.

Nach der künstlichen Besamung des *palmatus*-Eies mit *cristatus*-Sperma wird das Dotterhäutchen über dem Eifleck durchstochen und mit einer sehr feinen Pipette der Eikern samt einer kleinen Plasmaportion abgesogen (Methode Curry, 1931). Durch nachträgliche Chromosomenzählungen wurde für jeden Fall bewiesen, dass das *palmatus*-Chromatin entfernt worden war. Die sich entwickelnden Gewebe erwiesen sich als haploid, d.h. sie enthielten nur die 12 väterlichen Chromosomen.

Unsere bastardmerogonischen Keime zeigten einen ganz ähnlichen Entwicklungsverlauf wie der von Baltzer (1930) untersuchte Merogon *taeniatus*-Plasma × *cristatus*-Kern = (t) c. Nach normal durchlaufenen Frühstadien blieben die Keime während oder kurz nach Schluss des Medullarrohres stehen. Als höchste Leistung kommt es in einigen Fällen noch zu schwach vortretenden Augenblasen. Wir können das frühe Augenblasenstadium als Maximalstadium unserer merogonischen Kombination bezeichnen (ca. Glaesner-Stadium 19/20 [1]).

Warum verläuft die Entwicklung zuerst normal; warum bleibt sie später stehen ? Die histologische Untersuchung der im Entwicklungsstillstand begriffenen Keime kann zunächst etwas zur Lösung dieser Fragen beitragen. Neben weitgehend normal erscheinenden Organbezirken, wie Epidermis, Chorda, Medullarteile und Ursegmente finden sich im Kopfbereich ausgedehnte Herde degenerierter Zellen mit pyknotischen Kernen. Zugrunde gegangen sind hier vor allem die zwischen der Epidermis, dem Kopfdarm und den Hirnteilen liegenden Füllgewebe (Kopfmesenchym). Diese Befunde stimmen vollständig überein mit dem, was Baltzer früher (1930, Fig. 3 u. 4) für die Kombination (t) c festgestellt hatte.

Wir übertragen die von Baltzer gegebene Deutung auch auf

---

[1] Nach Glaesner, L.: *Normentafel zur Entwicklung des gemeinen Wassermolches (Molge vulgaris).* Jena, 1925.

unsern (p) c-Merogon und stellen uns vor, dass die degenerierten Keimbezirke die Grenze ihrer Entwicklungsfähigkeit frühzeitig erreichen und deshalb zugrunde gehen, dass sie aber überdies auch die Entwicklungseinstellung des ganzen Keimes verursachen. Von den noch gesund erscheinenden Organbezirken dagegen können wir annehmen, dass sie noch nicht am Ende ihrer Entwicklungsmöglichkeiten stehen, sondern nur sekundär durch die degenerierende Nachbarschaft an der Fortentwicklung gehindert werden.

Diese Annahme hat sich als eine fruchtbare Arbeitshypothese erwiesen. Um ihre Richtigkeit zu prüfen, muss man zweierlei tun: 1. die gesundbleibenden Organmaterialien von den degenerierenden Nachbargeweben trennen und 2. ihnen in einer neuen, günstigen Umgebung Gelegenheit zur Weiterentwicklung geben.

In einer ersten Versuchsreihe (Baltzer 1930, Hadorn 1930, 1932) wurden bastardmerogonische Gastrula-Stücke aus verschiedenen Organbezirken entnommen und in normalkernige entwicklungsfähige *palmatus*-Gastrulen gleichen Alters überpflanzt. Diese Implantate entwickelten sich weiter und übertrafen mit ihren Leistungen den Ganzmerogon ganz wesentlich. Sie erreichten in Verbindung mit dem Wirtskeim eine stark verlängerte Lebensdauer und kamen dabei zu höheren organologischen und histologischen Leistungen (dotterfreie Epidermis mit Sinnesknospe, Muskelfibrillen, Pigmentzellen, Nierenkanälchen, Hirn- und Rückenmarkteile etc., vergl. Hadorn 1932). Einzig die im Ganzmerogon zugrunde gehenden Kopfgewebe, degenerierten in gleicher Weise auch als Implantate.

Diese Experimente sprachen deutlich für die ungleiche Entwicklungsfähigkeit der verschiedenen Organmaterialen eines Merogons. Dabei blieb aber unklar, wie weit der normalkernige Wirt an der im einzelnen festgestellten Höherentwicklung beteiligt war. Um in dieser Richtung weiter zu kommen, waren neue Experimente nötig. Man musste versuchen, die einzelnen der bastardmerogonischen Gastrula entnommenen Keimstücke in einem unspezifischen Milieu weiterzuziehen. Nur so liess sich die Frage nach der verschiedenwertigen Entwicklungsfähigkeit exakter, d.h. ohne die bei den Implantaten unkontrollierbare Beteiligung eines Wirtskeimes untersuchen.

Nun hatte J. Holtfreter (1931) — als solche Experimente für mich in Frage kamen — eine Methode für die Aufzucht isolierter Teilstücke des Amphibienkeimes in mineralischer Salzlösung veröffentlicht. Dieses Verfahren war für die Lösung unseres Spezialproblemes das gegebene. Ich habe nach der Holtfreter' schen Methode zahlreiche Zuchtversuche mit bastardmerogonischem Material ausgeführt. Kleine Keimstücke aus verschiedenen Gastrulabezirken wurden steril entnommen und als Explantate in vitro steril weitergezogen.

Abb. 1.

Bastardmerogonisches Explantat: Aussenansicht und Schnitt. Epidermis (Ep.) weitgehend ausdifferenziert mit Sinnesknospe (S.K.) und Vakuolen (Vak.). Unter der Epidermis expandierte Melanophoren (Mel.). Mesodermale Schicht (Mes.) undifferenziert. Im Innern pyknotischer Zelldetritus (Pyk.). Vergr. ca. 140 ×.

Wir stellen an diese Experimente folgende Fragen: 1. Ueberleben einzelne Keimstücklein als Explantate den Ganzmerogon? 2. Wenn sie ihn überleben, kommt es dabei auch zu einer Höherentwicklung, so dass neue histologische Strukturen entstehen?

Die meisten Explantate überlebten den Ganzmerogon um einige Tage. In den besten Fällen war dieses Ueberleben besonders deutlich, indem das Maximalalter des Ganzkeimes um ca. 14 Tage übertroffen wurde. In bezug auf die histologische Weiterdifferenzierung verhielten sich die verschiedenen Organmaterialien verschieden:

Bei einer ersten Gruppe wurden neue histologische Strukturen ausgebildet, hinter denen die Leistungen des merogonischen Ganzkeimes weit zurückbleiben.

Die Abb. 1 zeigt eines der ältesten Explantate, das teilweise von Epidermis (Ep.) bekleidet ist und teilweise mit entodermalen Zellen (Ent.) an das Zuchtmedium grenzt. In der Epidermis wurden reichlich Flimmerzellen ausgebildet; am lebenden Explantat konnte die ausgiebige Cilienbewegung während der ganzen Zuchtdauer (14 Tage) beobachtet werden. An einer Stelle ist die Epidermis zu einem kleinen Zapfen (Z.) ausgewachsen. Unter der Epidermis liegen einige normal expandierte Melanophoren (Mel.). Im Schnitt stellen wir fest, dass der Dotter bis auf wenige Restkörner vollständig abgebaut wurde. Kleine, von Pigmentkörnchen umgebene Vakuolen (Vak.) sind eine spezifisch epidermale Zelleistung. Eine als Sinnesknospe (S.K.) kenntliche Zellgruppe ist in die Epidermis eingelagert. Die zweischichtige Anordnung der Zellen ist überall angedeutet, aber nicht vollkommen normal durchgeführt.

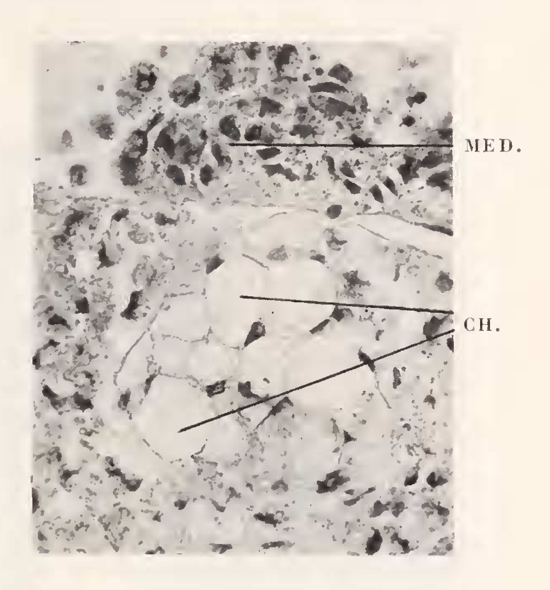


Abb. 2.
Ausschnitt aus einem bastardmerogonischen Explantat mit vakuolisierten Chordazellen (Ch.) u. undifferenziertem Medullarmaterial (Med.). Vergr. ca. 290 ×.

Auch Chordazellen erreichten in einigen Explantaten das Stadium der spezifisch histologischen Struktur. In Abb. 2 erkennen wir ein Nest vakuolisierter Zellen, bei denen die für Chorda typischen Zellwände deutlich ausgebildet sind (Ch.).

Eine zweite Gruppe von Organmaterial überlebte wohl den Ganzmerogon beträchtlich, ohne aber dabei zu höheren Leistungen zu gelangen. Die explantierten Zellen blieben während längerer Zeit auf der ersten Embryonalstufe stehen. Im Explantat der Abb. 1 finden wir unter der Epidermis eine zweite Zellschicht,

die mesodermaler Herkunft ist (Mes.) und sich zu Muskulatur hätte ausdifferenzieren sollen. Die Zellen sind noch vollgepfropft mit Dotterschollen und lassen keine spezifischen Strukturen erkennen; die Kerne blieben normal. In Abb.2 befindet sich über dem Chordagewebe eine Zellgruppe, die aus dem präsumptiven Medullarmaterial (Med.) stammt. Die Organzugehörigkeit ist höchstens an der grössern Kerndichte kenntlich. Eine Höherentwicklung ist während der acht-tägigen Weiterzucht nicht erfolgt.

Eine dritte Gruppe von explantierten Zellen ging zugrunde. Die Zellverbände wurden

	Ganzkeim	Implantat	Explantat
« Entwicklungs-alter » maximal:	Glaesner-Stad. 20 (frühes Augenblasen-Stadium)	Glaesner-Stad. 42* (Vorderbein mit 3 Zehen)	Glaesner-Stad. 41** (Vorderbein mit 2 Zehen)
Epidermis:	auf der ersten Embryonalstufe, dotterhaltig, meist einschichtig	dotterfrei mit Flimmerzellen, Saftvakuolen und Sinnesknospen, zweischichtig	weitgehend dotterfrei, mit Flimmerzellen, Saftvakuolen und Sinnesknospe, unvollkommen zweischichtig
Chorda:	noch keine Vakuolen	kaum vakuolisiert	einzelne Zellen normal vakuolisiert
Pigmentzellen:	fehlen	ausgebildet	ausgebildet
Medullar-material:	primitives Medullarrohr	höher entwickelte Hirn- und Rückenmarkteile	nur Ueberleben, strukturell wie beim Ganzkeim
Muskelmaterial:	erste Segmente	Myotome mit Fibrillen	nur Ueberleben, strukturell wie beim Ganzmerogon
Nieren-kanälchen:	fehlen	ausgebildet	nicht festgestellt
Füllgewebe des Kopfes (Kopf-mesenchym):	pyknotisch degeneriert	pyknotisch degeneriert	pyknotisch degeneriert

* Das Entwicklungsalter der bastardmerogonischen Implantate wird angegeben nach den vom Wirtskeim erreichten Stadien.

** Das Entwicklungsalter der Explantate wurde « gemessen » an gleichalten, unter gleichen Bedingungen aufgezogenen normalkernigen Kontrollkeimen.

aufgelöst, die Kerne sind pyknotisch degeneriert (Abb. 1, PYK.). Es ist dies die gleiche Erscheinung, die für die Füllgewebe des Kopfes im Ganzmerogon, sowie auch für die entsprechenden Implantatsteile festgestellt wurde.

In der nebenstehenden Tabelle sind die Leistungen der bastardmerogonischen Keimteile für den Ganzmerogon, das Implantat und das Explantat vergleichend neben einander gestellt. Es sei ausdrücklich hervorgehoben, dass diese Ergebnisse nicht als endgültig angesehen werden dürfen. Da die Variabilität bei Merogonieversuchen recht gross ist, könnten neue Experimente neue Leistungen aufdecken. Für die Ganzkeime allerdings scheint es kaum wahrscheinlich, dass die angegebene Maximalleistung noch wesentlich übertroffen werden dürfte.

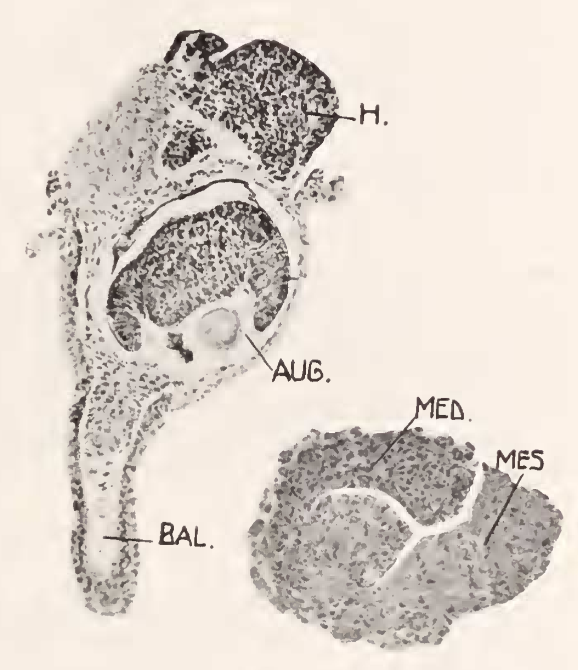


Abb. 3.
Explantatspaar aus der gleichen Zuchtschale. Links: bastardkerniges Kontrollstück mit Auge, Balancer und Hirnteil (H.). Rechts: das entsprechende bastardmerogonische Explantat mit undifferenziertem Medullar- und Mesodermteil (Med. u. Mes.). Vergr. ca. 70 ×.

Kontrollexperimente wurden einerseits mit homosperm-merogonischem Material ausgeführt (entkerntes Eiplasma × Spermachromatin der gleichen Art). Bei diesen Explantaten differenzierten sich Medullar- und Muskelmaterialien normal weiter. Daraus schliessen wir, dass nicht die Haploidität-an-sich, sondern die heterogene Plasma-Kernzusammensetzung den Leistungsausfall bei den entsprechenden bastardmerogonischen Materialen verursacht.

Ausserdem wurden zahlreiche Kontrollversuche mit gewöhnlichem diploidem Bastardgewebe durchgeführt (kernhaltiges Plasma von *palmatus* × Spermachromatin von *cristatus* = pc). Es wurde so vorgegangen, dass in der gleichen Zuchtschale je ein bastardkerniges Keimstück = pc neben einem bastardmerogonischen Explantat = (p) c aufgezogen wurde. Die beiden Isolate waren gleich alt, und stammten aus materialgleichen Gastrulabezirken. Ein solches Zuchtpaar ist in Abb. 3. nebeneinandergestellt. Beim (p) c-Stück (rechts) ist nur eine geringe organologische Gliederung angedeutet; die histologische Ausdifferenzierung der Medullar- und Mesodermteile unterblieb (Med. u. Mes.). Das den mütterlichen Artkern enthaltende pc-Kontrollexplantat (links) hat dagegen ein Auge mit Linse (Aug.), einen Hirnteil mit Nervenfasern und Ganglienkernschicht (H.) und einen Balancer (Bal.) ausdifferenziert. Diese unter genau gleichen äussern Bedingungen zustande gekommenen Leistungsunterschiede beweisen, dass nicht das Zuchtverfahren den teilweisen Leistungsausfall der bastardmerogonischen Materialien verursacht, sondern dass wiederum die heterogene Plasma-Kernzusammensetzung für die eingeschränkte Entwicklung der (p) c-Explantate verantwortlich gemacht werden muss.

Allgemeine Ergebnisse.

1. Die Explantate bestätigen die an den Implantaten gemachte Feststellung, dass unser heterogenes Plasma-Kerngemisch die Fähigkeit hat, in einzelnen Organmaterialien (Epidermis, Chorda) die Histogenese auszuführen oder doch in Angriff zu nehmen.

2. Die Explantate beweisen, dass Embryonalzellen auch ohne Artchromatin imstande sind, den Dotter selbständig abzubauen. Die von G. Hertwig (1922) aufgestellte Hypothese, wonach der Dotterabbau durch « eine spezifische Fermentwirkung des Kerns auf artspezifische Reservestoffe » erfolge, muss soweit abgelehnt werden, als von artspezifischen Reaktionen die Rede ist.

3. Die Explantate beweisen, dass die verschiedenen Organbezirke eines bastardmerogonischen Keimes in

verschiedenem Grade entwicklungsfähig sind. Dieses Resultat wurde schon durch die Histologie der Ganzmerogone angedeutet. Die Implantate brachten eine erste experimentelle Bestätigung. Die Explantate liefern den exakten und direkten Nachweis, indem es sich bei ihnen um Selbstleistungen in unspezifischer Umgebung handelt.

Besprechung.

Die Ursachen der Leistungsunterschiede zwischen den Implantaten und den Explantaten (vergl. die Tabelle) können hier nicht eingehend diskutiert werden. Ich verweise auf die ausführliche Arbeit (Hadorn 1934). Es sei nur festgestellt, dass in erster Linie 2 Arten der Entwicklungsförderung durch den Wirt in Frage kommen:

1. Eine allgemeine (unspezifische) stoffwechselphysiologische Hilfe durch die angrenzenden Gewebe des Wirtes.

2. Induzierende Wirkungen der normalkernigen Nachbarschaft.

Ob der Wirt dem Implantat ausserdem noch « spezifische, die Histogenese ermöglichende Stoffe » liefert, zu deren Produktion das heterogene Plasma-Kernsystem selbst nicht fähig ist, bleibe vorläufig dahingestellt.

Wie ist die abgestufte Entwicklungsfähigkeit der verschiedenen Organmaterialien zu erklären? Die Leistungen der bastardmerogonischen Zellen werden aufgefasst als Produkt einer artunspezifischen Zusammenarbeit von Plasma und Kern (Baltzer 1930, 1931, 1933; Hadorn 1932). Auf Grund genereller Entwicklungsfaktoren, die den verschiedenen Arten der Gattung *Triton* gemeinsam sind, kann die erste embryonale Arbeit geleistet werden. Erst später wird eine streng artspezifische Plasma-Kernarbeit verlangt (Baltzer 1933). Es ist nun wahrscheinlich, dass in einzelnen Organmaterialen, wie Epidermis und Chorda die generelle Plasma-Kernarbeit recht lange, d.h. bis in die Histogenese hinein wirkt, dass dagegen in andern Keimbezirken (Füllgewebe des Kopfes) viel früher artspezifische Reaktionen der Erbsubstanz verlangt werden, die unserer heterogenen Plasma-Kernkombination naturgemäss versagt sind.

Wir können mit unserer Erklärung noch einen Schritt weiter gehn. Die verschiedenen Arten der Gattung *Triton* sind zweifellos aus einer gemeinsamen Urform hervorgegangen. Durch Veränderungen der Erbsubstanz (Mutationen) haben sich aus dem (hypothetischen) « Ur-Triton » u.a. die Arten *palmatus* und *cristatus* entwickelt. Von der gemeinsamen Urform her haben die beiden Arten noch einen « Stock » gemeinsamer Erbfaktoren bewahrt. Aus unsern Experimenten schliessen wir, dass dies vornehmlich diejenigen Faktoren sind, die während der Frühentwicklung wirken. Nun liegt es im Wesen der Mutationen, dass sie häufig lokale Eigenschaften oder abgegrenzte Funktionen betreffen. Es ist nun möglich, dass die den « Ur-Triton » verändernden Mutationen die verschiedenen Organsysteme in verschiedenem Grade getroffen haben — in der Weise etwa, dass die in der Epidermis wirkenden Erbfaktoren des *cristatus*-Kernes noch weitgehend mit dem *palmatus*-Plasma zusammenarbeiten können, während die für die Gewebsentwicklung im Kopf bestimmten Faktoren tiefgreifender verändert wurden, so dass hier eine ähnliche Zusammenarbeit mit dem artfremden Plasma nicht mehr möglich ist.

Aus diesen Ueberlegungen, die allerdings weitgehend hypothetisch sind, liessen sich gewisse Beziehungen zu der von Plate (1926) vertretenen « Erbstockhypothese » entwickeln.

LITERATUR.

1920. Baltzer, F. *Ueber die experimentelle Erzeugung und die Entwicklung von Tritonbastarden ohne mütterliches Kernmaterial.* Verh. Schweiz. Naturf. Ges. Neuenburg.

1930. — *Ueber die Entwicklung des Tritonmerogons Triton taeniatus* (♀) · *cristatus* ♂. Rev. suisse de Zool. 37.

1931. — *Die Zusammenarbeit von Plasma und Kern in der tierischen Entwicklung.* Sitz. ber. Naturforsch. Ges. Bern. 1930/31.

1933. — *Ueber die Entwicklung von Triton-Bastarden ohne Eikern.* Verh. Deutsch. Zool. Ges.

1931. Curry, H. A. *Methode zur Entfernung des Eikerns bei normalbefruchteten und bastardbefruchteten Triton-Eiern durch Anstich.* Rev. suisse de Zool. 38.

1930. Hadorn, E. *Ueber die Organentwicklung in bastardmerogonischen Transplantaten bei Triton.* Rev. suisse de Zool. 37.

1932. — *Ueber Organentwicklung und histologische Differenzierung in transplantierten merogonischen Bastardgeweben (Triton palmatus* (♀) × *Triton cristatus* ♂). Roux' Archiv. f. Entw. mech. 125.

1934. — *Ueber die Entwicklungsleistungen bastardmerogonischer Gewebe von Triton palmatus* (♀) × *Triton cristatus* ♂ *im Ganzkeim und als Explantat in vitro.* Roux' Archiv f. Entw. mech. 131.

1922. Hertwig, G. *Die Bedeutung des Kerns für das Wachstum und die Differenzierung der Zelle.* Erg.-H. Anat. Anz. 55.

1931. Holtfreter, J. *Ueber die Aufzucht isolierter Teile des Amphibienkeimes. II. Züchtung von Keimen und Keimteilen in Salzlösung.* Roux' Arch. f. Entw. mech. 124.

1926. Plate, L. *Lamarkismus und Erbstockhypothese.* Zeitschr. f. ind. Abst.-u. Vererbungsl. 43.